

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

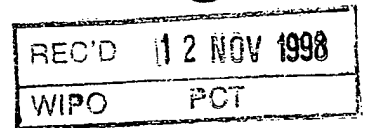


Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office eur péen EP 98/06065  
des brevets

23. Sep. 1998



Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

97116562.6

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts:  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

M.B. RIJLING

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE,

26/08/98



Eur päisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

1 230999

**Blatt 2 der Besch inigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.:  
Demande n°: 97116562.6

Anmeldetag:  
Date of filing: 23/09/97  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Dr. Rentschler Biotechnologie GmbH  
88471 Laupheim  
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
Flüssige Interferon-Beta Formulierungen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Tag:  
Date:  
Date:

Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:

A61K38/21, A61K9/08

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

## Flüssige Interferon- $\beta$ Formulierungen

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft flüssige Formulierungen von humanem Interferon- $\beta$ . Die Formulierungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie einen pH-Wert im schwach sauren bis neutralen Bereich zwischen 5 und 8 aufweisen sowie eine hohe Stabilität des Interferon- $\beta$  in Lösung unter Beibehalt der molekularen Integrität gegeben ist.

10

Natürlich vorkommende Interferone sind speziesspezifische Proteine, teilweise Glykoproteine, die durch unterschiedliche Zellen des Körpers nach Induktion mit Viren, doppelsträngiger RNA, anderen Polynukleotiden sowie Antigenen erzeugt werden. Interferone besitzen zahlreiche biologische Aktivitäten wie z.B. antivirale, antiproliferative sowie immunmodulatorische Eigenschaften. Es sind mindestens 3 unterschiedliche Typen humaner Interferone identifiziert worden, welche durch Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten sowie Zellen des Immunsystems produziert werden und als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Interferone bezeichnet werden. Einzelne Interferontypen können weiterhin in zahlreiche Subtypen unterteilt werden.

15

20

Natives, menschliches Interferon- $\beta$  kann durch Superinduktion humaner Fibroblastenzellkulturen mit Poly-IC sowie anschließende Isolierung und Reinigung des Interferon  $\beta$  durch chromatographische und elektrophoretische Techniken industriell hergestellt werden. Proteine oder Polypeptide, welche dem natürlichen Interferon- $\beta$  vergleichbare Eigenschaften aufweisen, können auch durch rekombinante DNA-Technologien hergestellt werden (EP-A-0 028 033; EP-A- 0 041 313; EP-A-0 070 906; EP-A-0 287 075; Chernajovsky et al. (1984) DNA 3, 297-308; McCormick et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4, 166-172). Dabei kann rekombinantes humanes Interferon- $\beta$  sowohl in eukaryontischen Zellen (z.B. CHO-Zellen) als auch von prokaryon-

30

tischen Zellen (z.B. E.coli) produziert werden. Die entsprechenden Interferone werden als Interferon- $\beta$ -1a bzw. Interferon- $\beta$ -1b bezeichnet. Im Gegensatz zu Interferon- $\beta$ -1b ist Interferon- $\beta$ -1a glykosiliert (Goodkin (1994) Lancet 344, 1057-1060).

5

Der therapeutische Einsatz von Interferon- $\beta$  setzt voraus, daß es in eine galenische Zubereitung gebracht wird, die das Protein über längere Zeit unter Erhaltung der molekularen Integrität lagerfähig macht. Interferon- $\beta$  ist instabil und unterliegt unterschiedlichen Abbaureaktionen. Hierzu gehören insbesondere die Spaltung von Peptidbindungen, Deamidierung, Oxidation des Methionins zu Methioninsulfid, Disulfidaustausch sowie Veränderungen der Zuckerseitenkette bis hin zur Deglycosilierung.

10

Aufgrund des therapeutischen Nutzens von Interferonen sind in den vergangenen Jahren eine Reihe von Formulierungen entwickelt worden, die jedoch alle gewisse Nachteile aufweisen. Das US-Patent Nr. 4,647,454 (Inter-Yeda Ltd.) beschreibt eine Formulierung von Fibroblasten Interferon- $\beta$ , die durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP) im stark sauren Bereich (pH 3,5) stabilisiert werden kann. Weitere bevorzugte Hilfsstoffe sind Mannitol, Humanserumalbumin sowie Acetatpuffer. Die Formulierung wird gefriergetrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

15

20

Die japanische Patentschrift 59 181 224 (Sumitomo Chemical Co.) beschreibt eine wässrige Lösung von Interferonen, bei welcher polare Aminosäuren wie Arginin, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Histidin, Lysin, Serin sowie Threonin bzw. deren Natriumsalze zusammen mit Humanserumalbumin zur Stabilisierung der Interferone eingesetzt werden.

25

Die internationale Patentanmeldung WO 95/31213 (Applied Research Systems ARS Holding) beschreibt eine flüssige Formulierung für Interferon- $\beta$ , die durch Zusatz eines Polyols, bevorzugt Mannitol, und eines nicht-reduzierenden Zuckers oder einer Aminosäure stabilisiert wird. Die

30

Formulierung enthält weiterhin einen Puffer (Acetatpuffer pH 3,0 bis 4,0) sowie Humanserumalbumin. Während Rezepturen mit einem pH-Wert zwischen 5 und 6 einen sofortigen Verlust an biologischer Aktivität zeigten, sind die in der Patentschrift bevorzugten Rezepturen bei pH-Werten von 3,0  
5 sowie 4,0 hinreichend stabil. Die Aussage der Stabilität bezieht sich jedoch nur auf die biologische Aktivität der Formulierung, nicht auf die molekulare Integrität des Wirkstoffs.

Die europäische Patentanmeldung EP 0 215 658 (Cetus Corp.) beschreibt  
10 eine Formulierung für rekombinantes Interferon- $\beta$ , in welcher die biologisch aktive Verbindung in einem wässrigen Medium bei einem pH-Wert zwischen 2 und 4 unter Zusatz von Stabilisatoren wie Humanserumalbumin oder Humanplasmafraktionen sowie gegebenenfalls Dextrose gelöst wird. Eine weitere Patentanmeldung der Cetus Corp. (WO 89/05158) beschreibt  
15 eine Formulierung für Interferon- $\beta$ , die bei einem pH-Wert zwischen 2 und 4 als Stabilisatoren entweder Glycerin oder Polyethylenglycopolymere mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 190 bis 1.600 Dalton einsetzen. Als geeignete Pufferkomponenten werden Glycin, Phosphorsäure sowie Zitronensäure genannt.

20 Die europäische Patentanmeldung EP 0 217 645 (Cetus Corp.) beschreibt pharmazeutische Zubereitungen mit IL-2 oder Interferon- $\beta$ , die in einem Trägermedium bei pH 7 bis 8 gelöst und unter Zusatz von Natriumlaurat als oberflächenaktive Verbindung stabilisiert sind. Darüber hinaus wird zur  
25 Stabilisierung dieser Zubereitungen auch SDS als weitere ionische oberflächenaktive Verbindung benötigt.

Das europäische Patent EP 0 270 799 (Cetus Oncology Corp.) beschreibt eine Formulierung für nichtglycosyliertes rekombinantes Interferon- $\beta$  in einem  
30 inerten Trägermedium auf Wasserbasis, das als Stabilisator nichtionische polymere Detergenzien enthält.

Neben Formulierungen für Interferon- $\beta$  sind auch pharmazeutische Darreichungsformen mit Interferon- $\alpha$  beschrieben. Die europäische Patentschrift O 082 481 (Schering Corp.) offenbart eine zur Gefriertrocknung bestimmte wässrige Formulierung, die neben einem Phosphatpuffer und Glycin Humanserumalbumin enthält. Als weiterer optionaler Bestandteil wird Alanin genannt. Der pH-Wert der Lösung nach Rekonstitution liegt zwischen 7,0 und 7,4. Eine weitere Patentanmeldung der Schering Corp. (WO 96/11018) offenbart stabile wässrige Lösungen im Interferon- $\alpha$ , die bei einem pH-Wert zwischen 4,5 und 7,1 Chelatbildner (NaEDTA oder Zitronensäure), eine oberflächenaktive Verbindung (Polysorbat 80), ein Isotonisierungsmittel (Natriumchlorid) sowie geeignete Konservierungsmittel wie Methylparaben, Propylparaben, m-Kresol oder Phenol beinhalten. Die offenbarten wässrigen Formulierungen erweisen sich bezüglich der biologischen Aktivität (Standardmethode der Hemmung des zytopathischen Effekts (CPE) eines Virus wie beschrieben bei W.P. Protzman in J. Clinical Microbiology, 1985, 22, S. 596-599) bei 25°C für 6 Monate als stabil (biologische Aktivität >90% der Ausgangsaktivität). Eine parallel durchgeführte Bestimmung des Proteingehalts mittels HPLC weist nach 6 Monaten bei 25°C jedoch bereits Gehaltsverluste zwischen 20,2 (Tab.3) oder 32,5% (Tab. 4) aus.

EP-A-O 641 567 (Ciba Geigy AG) beschreibt pharmazeutische Zusammensetzungen, die Hybrid-Interferon- $\alpha$  und als Stabilisator einen Puffer mit einem pH-Wert zwischen 3.0 und 5.0 enthalten.

Das US-Patent 5,358,708 (Schering Corp.) beschreibt wässrige Formulierungen von Interferon- $\alpha$ , die als Stabilisator Methionin, Histidin oder Mischungen davon enthalten. Nach zweiwöchiger Lagerung einer Interferon- $\alpha$  Lösung bei 40°C wird bereits eine Abnahme des Wirkstoffgehalts um 20% gefunden.

Die oben aufgeführten Formulierungen für Interferone sind aus heutiger Sicht mit Nachteilen behaftet, da z.B. auf Zusatz von Humanserumalbumin zur Stabilisierung von Proteinen aus Gründen der gestiegenen Anforderungen an die Sicherheit vor Viruskontaminationen durch Blutspender verzichtet werden sollte. Desweiteren ist für eine Vielzahl der oben beschriebenen Formulierungen ein Zusatz von Aminosäuren und/oder eine Gefriertrocknung erforderlich. Gefriergetrocknete Produkte sind jedoch in ihrer Herstellung sehr aufwendig und entsprechend teuer und erfordern durch die Notwendigkeit zur Rekonstitution einen zusätzlichen Arbeitsschritt, der insbesondere für Patienten mit eingeschränkter Motorik oftmals nur sehr schwer zu vollziehen ist. Eine Reihe von Rezepturen weisen einen pH-Wert unter 4,0 auf. Obschon derartige Werte nicht gänzlich unüblich sind (siehe auch S. Sweetana und N.J. Aders, Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology, 1996, 50: 330-342), muß bei intramuskulärer oder subkutaner Applikation mit schmerzhaften Irritationen gerechnet werden. Die Verwendung von oberflächenaktiven Verbindungen, wie Polysorbat 80, ist entsprechend Sweetana und Akers zwar zulässig, es sind jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen insbesondere auch bei Kindern und Neugeborenen beschrieben, die den Einsatz derartiger Hilfsstoffe in Frage stellen. Über die Toxizität von oberflächenaktiven Verbindungen wird zusammenfassend bei Attwood und Florence (Surfactant Systems, their Chemistry, Pharmacy and Biology, Chapman and Hall; London, 1983) berichtet. Eine Übersicht über die Pharmakologie von Polysorbat 80 befindet sich bei R.K. Varma et al. (Arzneim.-Forsch./ Drug Res. 35, 1985, 804-808).

25

Aufgrund der oben genannten Nachteile, sollte eine optimale Formulierung für Interferon- $\beta$  folgende Eigenschaften in sich vereinigen:

- Erhalt der biologischen Aktivität über den Lagerzeitraum,
- 30 - Erhalt der molekularen Integrität des Wirkstoffmoleküls über den Lagerzeitraum,



- Flüssige Formulierung, Verzicht auf eine teure Gefriertrocknung sowie die zusätzliche Rekonstitution,
- Verzicht auf risikobehaftete Hilfsstoffe wie Humanserumalbumin oder oberflächenaktive Verbindungen,
- 5 - pH-Wert im neutralen bis schwach sauren Bereich.

Sämtliche Forderungen werden durch die im nachfolgenden Abschnitt genauer beschriebene Erfindung erfüllt.

10 Überraschenderweise wurde eine Rezepturzusammensetzung gefunden, welche die molekulare Integrität von Interferon- $\beta$  in flüssiger Form über einen langen Zeitraum in einem physiologischen pH-Bereich zwischen 5 und 8 sicherstellt, ohne auf die als nachteilig bekannten Hilfsstoffe des Standes der Technik zurückgreifen zu müssen.

15

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine flüssige pharmazeutische Formulierung, die Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 enthält sowie eine biologische Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach einer  
20 Lagerung bei 25°C für drei Monate aufweist.

Die Messung der Langzeitstabilität von flüssigen pharmazeutischen Formulierungen erfolgte bei 25°C. Die Temperatur von 25°C wurde gewählt, um auf der einen Seite eine Beschleunigung von Abbaureaktionen  
25 zu bewirken, auf der anderen Seite jedoch keine durch überhöhte Temperaturen bewirkten Artefakte hervorzurufen. Geeignete analytische Methoden zur Bestimmung der Stabilität von Interferon- $\beta$  sind in den Übersichtsartikeln von J. Geigert (J. Parent. Sci. Technol. 43 (1989), 220-224) oder M.C. Manning, K. Patel und R.T. Borchardt (Pharm. Res. 6 (1989), 903-918)  
30 beschrieben.

Die Messung der biologischen Aktivität nach der jeweils gewählten Aufbewahrungsdauer erfolgte durch die Standardmethode der Inhibierung des zytopathischen Effekts eines Virus. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Testmethode findet sich bei Stewart, W.E. II (1981): The Interferon System (Second, enlarged Edition), Springer-Verlag: Wien, New York; Grossberg, S.E. et al. (1984), Assay of Interferons. In: Came, P.E., Carter W.A (eds) Interferons and their Applications, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43. Eine erfindungsgemäße Formulierung weist nach dreimonatiger Aufbewahrung bei 25°C eine biologische Aktivität von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 85% und besonders bevorzugt von mindestens 90% der Ausgangsaktivität auf.

Vorzugsweise besitzt eine erfindungsgemäße Formulierung nach sechsmonatiger Aufbewahrung bei 25°C eine biologische Aktivität von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 85% der Ausgangsaktivität.

Auch bei einer Aufbewahrung bei höheren Temperaturen, z.B. 37°C, weisen die erfindungsgemäßen Formulierungen eine überraschend hohe Langzeitstabilität der biologischen Aktivität auf. So wird nach einer einmonatigen Aufbewahrung bei 37°C eine biologische Aktivität von mindestens 70% und vorzugsweise von mindestens 80% der Ausgangsaktivität gefunden.

Die erfindungsgemäße flüssige pharmazeutische Formulierung ist vorzugsweise frei von Humanserumalbumin und besonders bevorzugt - abgesehen vom Wirkstoff - frei von humanen oder tierischen Polypeptiden. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäße flüssige pharmazeutische Formulierung frei von oberflächenaktiven Mitteln, insbesondere frei von ionischen Detergenzien oder/und nichtionischen Tensiden ist.

Die erfindungsgemäße Formulierung enthält als Wirkstoff ein Interferon- $\beta$ , d.h. ein Polypeptid, welches biologische oder/und immunologische Eigenschaften von natürlichem humanem Interferon- $\beta$  aufweist und ein

natürlich vorkommendes oder rekombinantes Interferon- $\beta$  sein kann. Vorzugsweise enthält die Formulierung ein glykosiliertes Interferon- $\beta$ , besonders bevorzugt ein rekombinantes Interferon- $\beta$  aus CHO-Zellen. Am meisten bevorzugt werden Interferon- $\beta$  Spezies verwendet, wie sie aus der  
 5 Zelllinie BIC 8622 (ECACC 87 04 03 01) erhältlich sind und beispielsweise in EP-B-O 287 075 und EP-A-O 529 300 beschrieben sind.

Der Wirkstoff kann in der erfindungsgemäßen Formulierung grundsätzlich in beliebiger Dosierung bzw. Konzentration vorliegen. Bevorzugt ist jedoch eine  
 10 Dosierung im Bereich von 1 bis 30 MU/ml, besonders bevorzugt von 3 bis 20 MU/ml. Bei diesen Dosierungsbereichen wurde eine besonders gute Stabilität bei erhöhter Temperatur gefunden.

Ein weiteres bevorzugtes Merkmal der erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierung ist, daß sie eine chemische Integrität nach  
 15 Lagerung bei 25°C für 3 Monate und vorzugsweise für 6 Monate aufweist, d.h. daß sie beständig gegenüber Peptidspaltung, Oxidation und Deglykosylierung ist. Die Messung der chemischen Integrität erfolgt durch Peptidmapping, Westernblot sowie Glykosylierungsanalyse. Als chemisch stabil im  
 20 Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind Formulierungen zu betrachten, bei welchen das Interferon- $\beta$  mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90% der chemischen Integrität bei den gewählten Lagerungsbedingungen beibehält.

Ein weiteres bevorzugtes Merkmal der erfindungsgemäßen flüssigen pharmazeutischen Formulierungen ist eine physikalische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate und vorzugsweise für 6 Monate. Dabei wird die physikalische Integrität durch Messung der Transmission bei  
 25 420 nm sowie durch visuelle Betrachtung der Lösungen gemessen. Als physikalisch stabil sind diejenigen Lösungen anzusehen, deren Transmission  
 30 über 90%, vorzugsweise über 93% bei den gewählten Lagerungsbedingungen

gen liegt, und bei welchen keine feststellbare Trübung bei visueller Betrachtung festgestellt werden konnte.

Durch die vorliegende Erfindung können überraschenderweise flüssige  
 5 Formulierungen von Interferon- $\beta$  bereitgestellt werden, die über einen langen  
 Zeitraum biologisch, chemisch und physikalisch stabil sowie frei von  
 unerwünschten Inhaltsstoffen wie etwa Humanserumalbumin oder  
 oberflächenaktiven Mitteln sind. Die erfindungsgemäßen Formulierungen  
 enthalten neben dem Wirkstoff einen Puffer, der vorzugsweise in einer  
 10 Konzentration von 10 mmol/l bis 1 mol/l, besonders bevorzugt in einer  
 Konzentration von 20 mmol/l bis 200 mmol/l, z.B. ca. 50 mmol/l bis  
 100 mmol/l vorliegt und dazu dient, den pH-Wert der Formulierung im  
 Bereich von 5 bis 8, vorzugsweise zwischen 6 und 7,4 zu halten. Der Puffer  
 wird aus pharmazeutisch akzeptablen Puffern ausgewählt, z.B. Borat-,  
 15 Succinat-, L-Malat-, TRIS-, Salicylat-, Glycylglycin-, Triethanolamin-,  
 Isocitrat-, Maleat-, Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffer oder Mischungen  
 davon. Bevorzugt verwendet man Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffer oder  
 Mischungen davon, besonders bevorzugt Citratpuffer.

20 Die erfindungsgemäße Formulierung kann neben dem Wirkstoff und dem  
 Puffer weitere physiologisch verträgliche Hilfsstoffe enthalten, beispiels-  
 weise Hilfsstoffe zur Anpassung der Tonizität an die Tonizität des Blutes  
 oder Gewebe, z.B. nichtreduzierende Zucker, Zuckeralkohole wie Mannit,  
 Sorbit, Xylit oder Glycerin. Außerdem können der erfindungsgemäßen  
 25 Formulierung eine oder mehrere Aminosäuren wie z.B. Alanin, Arginin,  
 Glycin, Histidin oder/und Methionin zur weiteren Erhöhung der chemischen  
 Stabilität zugesetzt werden. Bevorzugt ist hierbei Methionin. Die Konzen-  
 tration von Methionin liegt vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 4 mmol/l.  
 Besonders bevorzugt ist eine Konzentration vom 2 mmol/l. Weiterhin kann  
 30 die Zusammensetzung Verdickungsmittel zur Viskositätserhöhung, z.B. für  
 ophthalmologische Zwecke, enthalten. Beispiele für geeignete Verdickungs-

mittel sind ophthalmologisch geeignete Polymere, z.B. Carbopol, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose etc.

5 Darüber hinaus kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung auch Konservierungsmittel enthalten. Für ophthalmologische Zwecke kann beispielsweise Thiomersal in einer Menge von 0,001 bis 0,004% (Gewicht/-Volumen) zum Einsatz kommen.

10 Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Präparate, die eine flüssige Interferon- $\beta$  enthaltende Formulierung wie oben beschrieben enthalten. Diese pharmazeutischen Präparate sind insbesondere für die orale, parenterale oder ophthalmologische Applikation geeignet. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung derartiger pharmazeutischer Präparate, wobei man eine erfindungsgemäße Formulierung und gegebenenfalls weitere galenisch notwendige Hilfsstoffe zubereitet und in eine geeignete Darreichungsform bringt.

15 Die erfindungsgemäße Formulierung kann in geeigneten, gewaschenen sowie sterilisierten Glasvials (hydrolytische Klasse 1) mit pharmazeutisch akzeptablen Gummistopfen gelagert werden.

20 Desweiteren können erfindungsgemäße Formulierungen auch aseptisch in Fertigspritzen oder aber in Karpulen zum Einsatz in Selbstinjektionssystemen abgefüllt und eingesetzt werden. Die wässrigen Lösungen können - obwohl dies nicht bevorzugt ist - durch Zusatz weiterer, dem Fachmann bekannter Hilfsstoffe gefriergetrocknet werden und stehen dann nach Rekonstitution in flüssiger Form zur Verfügung.

25 Unter Zusatz von geeigneten Konservierungsmitteln können flüssige Mehrfachdosisarzneiformen sowie Augentropfenlösungen und Tropflösungen zur oralen Applikation hergestellt werden.

Die zur Herstellung der entsprechenden Darreichungsformen noch zusätzlich benötigten Hilfsstoffe sind dem Fachmann bekannt.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

5

### Beispiele

Ein aus CHO-Zellen gewonnenes Interferon- $\beta$  wurde auf einen Gehalt von ca. 10 bis 15 MU/ml (d.h. 10 bis 15  $\times 10^6$  I.E./ml) verdünnt.

10

### 1. Bestimmung der Langzeitstabilität von flüssigen Interferon- $\beta$ Formulierungen

15 Es wurden folgende Formulierungen getestet:

Formulierung 1: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0

Formulierung 2: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l, Natriumphosphat pH 7,0, 15 mg/ml Humanserumalbumin, 2 mmol/l Methionin, 50 mg/ml Glycerin

20

Formulierung 3: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat pH 7,0, 50 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methionin

Formulierung 4: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat pH 7,0, 2 mmol/l Methionin

25

Formulierung 5: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat pH 7,0

Die Formulierungen wurden in Glasvials der hydrolytischen Klasse 1 (DIN 2R Vials), die mit handelsüblichen Chlorbuthylgummistopfen verschlossen waren, bei 25°C für die angegebene Zeitdauer gelagert. Die Bestimmung der biologischen Aktivität (in vitro) erfolgte, wie beschrieben bei Stewart, W.E. II (1981): The Interferon System (Second, enlarged edition) Springer-

30

Verlag: Wien, New York; Grossberg, S.E. et al. (1984) Assay of Interferons.  
In: Came, P.E., Carter W.A. (eds.) Interferons and their Applications,  
Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 23-43.

- 5 Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 5 dargestellt. Bei "% (Ref)" handelt es sich um die Angabe der biologischen Aktivität bezogen auf die biologische Aktivität einer bei -20°C für den angegebenen Zeitraum gelagerten Referenzprobe. Bei "% (0Mo)" handelt es sich um die prozentuale biologische Aktivität bezogen auf den Ausgangswert bei 0 Monaten.

10

Tabelle 1 (Formulierung 1):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo)
0	11,0	11,0	100	100
1	10,0	9,8	98	89
2	9,7	11,0	113	100
3	10,0	10,6	106	96
4	10,3	9,5	92	86
5	9,5	9,7	102	88
6	10,5	10,2	97	93

15

20

Tabelle 2 (Formulierung 2):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo)
0	13,9	13,9	100	100
1	14,0	11,9	85	86
2	13,0	11,6	89	83
3	13,1	9,6	73	69
4	12,5	8,8	70	63
5	11,0	8,2	75	59
6	13,3	8,4	63	60

Tabelle 3 (Formulierung 3):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo)
0	12,5	12,5	100	100
1	9,4	10,0	106	80
2	8,3	11,5	139	92
3	7,8	11,8	151	94,4
4	6,8	10,3	151	82,4
5	6,6	11,2	170	89,6
6	7,8	13,4	172	107,2



Tabelle 4 (Formulierung 4):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo)
0	11,4	11,4	100	100
1	10,5	10,2	97	89
2	11,9	11,1	93	97
3	10,8	10,0	93	88
4	10,4	9,3	89	82
5	11,6	8,4	72	74
6	12,4	9,5	77	83

Tabelle 5 (Formulierung 5):

Monate	Wirkstoffgehalt			
	MU/mL		Recovery (25°C)	
	-20°C	25°C	% (Ref.)	% (0Mo)
0	11,3	11,3	100	100
1	11,0	9,7	88	86
2	11,7	10,1	86	89
3	11,1	10,2	92	90
4	11,3	10,2	90	90
5	12,0	9,2	77	81
6	11,0	9,7	88	86

Aus den obigen Tabellen ist ersichtlich, daß Formulierungen, die kein Humanserumalbumin enthalten (Formulierungen 1, 3, 4, 5), überraschenderweise eine bessere Stabilität als eine Humanserumalbumin enthaltende Formulierung (Formulierung 2) aufweisen.

5

## 2. Stabilität von flüssigen IFN- $\beta$ Formulierungen bei 37°C

Es wurden folgende Formulierungen in Fertigspritzen getestet:

- 10 Formulierung 6: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat  
pH 7,0, 2 mmol/l Methionin
- Formulierung 7: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0, 18 mg/ml Glycerin, 2  
mmol/l Methionin
- Formulierung 8: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 5,0, 18 mg/ml Glycerin, 15  
15 mg/ml Humanserumalbumin, 2 mmol/l Methionin
- Formulierung 9: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 6,0, 18 mg/ml Glycerin, 2  
mmol/l Methionin
- Formulierung 10: 50 mmol/l Natriumcitrat pH 6,5, 18 mg/ml Glycerin, 2  
mmol/l Methionin

20

Die Formulierungen wurden in Dosisstärken von 3 MU pro 0,5 ml (Dosisstärke 3), 6 MU pro 0,5 ml (Dosisstärke 6) und 12 MU pro ml (Dosisstärke 12) getestet.

25

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6

Lagerung in Monaten	Dosisstärke 3						Dosisstärke 6						Dosisstärke 12					
	Formulierung						Formulierung						Formulierung					
	6	7	8	9	10		6	7	8	9	10		6	7	8	9	10	
0	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	
1	71	80	61	74	69		72	85	63	86	84		87	88	71	76	84	
2	51	82	33	74	85		61	81	43	80	76		69	88	48	77	81	
3	44	76	23	63	65		48	64	36	73	69		66	72	35	80	81	
4	33	56	16	61	61		46	65	26	84	-		-	64	24	78	79	

5

10

Aus den Ergebnissen von Tabelle 6 ist ersichtlich, daß die erfindungsgemäßen Formulierungen ohne Humanserumalbumin überraschenderweise eine verbesserte Stabilität bei 37°C aufweisen.

5 3. Bestimmung der chemischen Stabilität

Um die chemische Stabilität flüssiger Formulierungen von IFN-β zu untersuchen, wurden sechs Ansätze formuliert und bei 25°C eingelagert. Nach 3 bzw. 6 Monaten erfolgte eine Charakterisierung des Proteins mittels  
10 eines Lys-C-Mappings und einer kompletten Kohlenhydratanalytik. Ein spezielles Augenmerk wurde auf die Bildung von Methionin-Sulfoxid und die Desialylierung gelegt.

Es wurden folgende Formulierungen getestet:

15

Formulierung 11: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat, 2 mmol/l Methionin pH 7,0 bis 7,2

Formulierung 12: 50 mmol/l Natriumcitrat, 50 mmol/l Natriumphosphat pH 7,0 bis 7,2

20 Formulierung 13: 50 mmol/l Natriumcitrat, 18 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methionin, pH 5,0 bis 5,2

Formulierung 14: 50 mmol/l Natriumcitrat, 18 mg/ml Glycerin, pH 5,0 bis 5,2

Formulierung 15: 50mmol/l Natriumcitrat, 15 mg/ml Humanserumalbumin (Medical Grade), 18 mg/ml Glycerin, 2 mmol/l Methio-  
25 nin, pH 5,0 bis 5,2,

Formulierung 16: 50mmol/l Natriumcitrat, 15 mg/ml Humanserumalbumin (Medical Grade), 18 mg/ml Glycerin, pH 5,0 bis 5,2

30 Der Gehalt an IFN-β lag bei allen Ansätzen zwischen 10 und 11 MU/ml.

Testdurchführung

Für die Durchführung der Analytik war eine Aufkonzentrierung der Proben notwendig. Zudem mußte bei den Ansätzen 15 und 16 das Humanserumalbumin entfernt werden. Deshalb wurden die Ansätze über eine Anti- $\beta$ -Chromatographiesäule gegeben. Das Ausgangsvolumen pro Ansatz betrug 32 ml. Die Ansätze 13 bis 16 wurden durch Zugabe von 2,1 ml 0,4 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 2,1 ml 0,4 mol/l  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  vor der Anti- $\beta$ -Chromatographie neutralisiert.

10

Für die Immunadsorption von Interferon- $\beta$  an einem monoklonalen Antikörper gegen Interferon- $\beta$  (B02 Sepharose 6B, cross linked von der Firma Celltech) wurde eine Chromatographiesäule C10 (Firma Pharmacia) mit 5 ml B02-Sepharose gepackt und 3 mal mit je 5-10 Gelvolumina PBS, 0,1 mol/l Natriumphosphat pH 2,0 und PBS/1 mol/l KCl, mit einer linearen Flußrate von 1,0 cm/min gespült.

15

Der Auftrag von ca. 32 ml der Interferon/HSA haltigen Lösung erfolgte mit einer linearen Flußrate von 0,5 cm/min.

20

Die Waschung erfolgte mit 10 Gelvolumina PBS/1 mol/l KCl mit einer linearen Flußrate von 1 cm/min bis zum Abfall der OD auf die Grundlinie. Die Elution erfolgte mit ca. 1-2 Gelvolumina 0,1 mol/l Natriumphosphat pH 2,0 mit einer linearen Flußrate von 1 cm/min. Interferon- $\beta$  wird dabei als einzelner Peak in hoher Reinheit erhalten. Dieses Eluat ist für die sich anschließende Proteincharakterisierung geeignet.

25

30

Durchführung der Analytik

## 1. Lys-C-Mapping

- 5 Mit dem Enzym Endoproteinase Lys-C aus *Achromobacter* (AP) wird Interferon- $\beta$  unter reduzierenden Bedingungen am C-terminalen Ende von Lysin in 12 Peptide gespalten.

- 10 In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 50  $\mu$ l Eluat aus der Anti- $\beta$ -Chromatographie (12,5-50  $\mu$ g Interferon- $\beta$ ) gegeben und mit 5  $\mu$ l 2 mol/l TRIS versetzt. Dazu wurde Endoproteinase der Firma Wako in einem Enzym/Substratverhältnis von 1:10 zugegeben (Endoproteinase Lys-C-Lösung in 50 mmol/l TRIS/HCl, pH 9,0). Die Lösung wurde gemischt und bei 30°C 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 5  $\mu$ l 0,1 mol/l  
15 DTT zum Ansatz.

- Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine reversed phase Säule (Vydac C18, 300 Å, 5  $\mu$ m, 2,1 mm) an einer HPLC-Anlage HP 1090 M-Serie mit Diodenarraydetektor bei 214 nm, wobei ein Gradient aus A: 0,1% (v/v) TFA und B: 0,1% (v/v) TFA/70% (v/v) Acetonitril verwendet wurde. Die  
20 Peptide wurden in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten durchnummeriert und sind folgenden Sequenzen zugeordnet.

Peptid	Position	Sequenz
AP1	109-115	EDFTRGK
AP2	100-105	TVLEEK
AP3	46-52	QLQQFQK
AP4(ox)	116-123	LM(ox)SSLHLK
AP4	116-123	LMSSLHLK
AP6(ox)	34-45	DRM(ox)NFDIPEEIK
AP5	124-134	RYYGRILHYLK
AP6	34-45	DRMNFDIPEEIK
AP7	20-33	LLWQLNGRLEYCLK
AP8(ox)	1-19	M(ox)SYNLLGFLQRSSNFQCQK
AP8	1-19	MSYNLLGFLQRSSNFQCQK
AP9	137-166	EYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRLN
AP10(ox)	53-99	EDAALTIYEM(ox)LQNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLK
AP10	53-99	EDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSS TGWNETIVENLLANVYHQINHLK

#### Literatur:

Utsumi et al. (1989): Characterization of four different mammalian-cell-derived recombinant human interferon- $\beta$ 1. Eur. J. Biochem. 181, 545-553.

Utsumi et al. (1988): Structural characterization of fibroblast human interferon- $\beta$ 1. J. Interferon Res. 8, 375-384

Allen, G. (1981): Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Sequencing of proteins and peptides. Elsevier Verlag.

Castagnola et al. (1988): HPLC in Protein sequence determinations. J. Chromatography 440, 213-251.

In den mit (ox) bezeichneten Peptiden liegt die Aminosäure Methionin als Methioninsulfoxid vor. Die Quantifizierung beruht auf der Bestimmung des Anteils der Peakfläche des oxidierten Peptides zur Gesamtfläche aus intaktem Peptid und oxidiertem Peptid. Die Anteile an oxidierten Methioninen sind in frischen Präparationen von Interferon- $\beta$  sehr gering. Während der Lagerung nimmt dieser Anteil je nach Lagerbedingungen (Puffer, pH-Wert, Temperatur etc.) mehr oder weniger stark zu. Diese Veränderung ist nicht gewünscht, da sie zur Instabilität des Interferon- $\beta$ -Moleküls beiträgt bzw. die in vivo Eigenschaften signifikant beeinflussen kann.

Der Anteil der oxidierten Peptide AP4(ox), AP6(ox), AP8(ox) und AP10(ox) ist somit ein wichtiges Kriterium zur Bewertung der chemischen Integrität des Interferon- $\beta$ -Moleküls in einer flüssigen Formulierung.

## 2. Kohlenhydratbestimmung

Im ersten Schritt wurden die Oligosaccharide vom Polypeptid abgetrennt und entsalzt.

Etwa 0,7 ml des Eluats der Anti- $\beta$ -Chromatographie wurden in einem Dialyseschlauch (6 mm Durchmesser Sigma No. D-9277) gegen 500 ml Dialysepuffer (0,05 mol/l Natriumphosphat, 0,10 mol/l NaCl, pH 7,25) unter leichtem Rühren 16-20 Stunden bei Raumtemperatur dialysiert. Danach wurde der Schlauch an einem Ende aufgeschnitten und der Inhalt in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestreift. Das Probenvolumen betrug nach der Dialyse 1 ml.

Zu der dialysierten Probe wurden 20  $\mu$ l Tween 20 (10%ig) und 15  $\mu$ l N-Glycosidase-F-Lösung (Boehringer Mannheim) pipettiert. Dieses Gemisch



wurde 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurde bei 10.000 U/min 10 min zentrifugiert, über 0,45 µm filtert und anschließend über eine Entsalzungssäule (HR 10/10 Pharmacia No. 17-0591-01) mit einem isokratischen Gradienten (Eluent A: destilliertes Wasser) mit einem Fluß von 1,0 ml/min chromatographiert und fraktioniert. Die Detektion der freien Oligosaccharide erfolgte bei 206 nm.

Im zweiten Schritt wurden die freigesetzten Oligosaccharide über einen Ionenaustauscher aufgetrennt nach der Anzahl ihrer Sialinsäurenreste differenziert.

Die im Eluat der Entsalzungssäule, ca. 2 ml, enthaltenen Oligosaccharide wurden an einen Anionenaustauscher (Mono Q HR 5/5, Pharmacia No. 17-0546-01) gebunden. Die Asialoformen finden sich im Durchlauf. Mit Hilfe eines flachen NaCl-Gradienten eluierten Monosialo-, Disialo- und Trisialoformen in der angegebenen Reihenfolge deutlich getrennt nacheinander.

Eluent A: Milli-Q-Wasser

Eluent B: 0,10 mol/l NaCl

#### Gradient

0 min	100% A	0% B
5 min	100% A	0% B
25 min	33% A	67% B
26 min	100% A	0% B

Fluß: 0,75 ml/min

Laufzeit: 26 min (mit Regeneration 36 min)

Detektion: UV 206 nm

Die Detektion der einzelnen Oligosaccharidfraktionen erfolgte mittels eines UV-Detektors bei 206 nm. Die quantitative Berechnung wurde über die Integration der Flächen der einzelnen Peaks durchgeführt.

- 5 Die Oligosaccharidfraktionen Monosialo, Disialo und Trisialo wurden anschließend, wie oben beschrieben, über eine Entsalzungssäule geleitet.

10 Im dritten Schritt werden die geladenen Oligosaccharide in neutrale Oligosaccharide überführt, indem unter sauren pH-Bedingungen die endständigen Sialinsäurenreste hydrolytisch abgespalten wurden.

Dazu wurden von jeder Oligosaccharidfraktion ca. 15  $\mu$ l plus 15  $\mu$ l Milli Q Wasser in ein Mikroteströhrchen gegeben und 30  $\mu$ l 10 mmol/l  $H_2SO_4$  zugefügt. Anschließend wurde 90 min lang auf 80°C erhitzt.

15

Danach wurde 1 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Ansatz in ein Minivial pipettiert. Die jetzt neutralen Kohlenhydrate werden bei alkalischem pH-Wert zu schwachen Anionen und an eine Anionenaustauschersäule (CarboPac PA1 (4x250 mm) P/N 35391, Dionex) gebunden. Die Elution erfolgt mit einem Gradienten aus

20

Eluent A: NaOH 0,16 mol/l

Eluent B: NaOH 0,16 mol/l Na-Acetat 0,10 mol/l

Eluent C: NaOH 0,16 mol/l Na-Acetat 0,75 mol/l

25

Gradient:

5

0 min	95% A	5% B	0% C
2,0 min	95% A	5% B	0% C
3,0 min	85% A	15% B	0% C
4,0 min	85% A	15% B	0% C
28,0 min	37% A	63% B	0% C
28,1 min	90% A	0% B	10% C
45,0 min	20% A	0% B	80% C
45,1 min	95% A	5% B	0% C
50,0 min	95% A	5% B	0% C

10

Fluß: 1,0 ml/min

Laufzeit: 50 min

Detektion: PAD

15

Zur Bestimmung der Oligosaccharide wird die PAD (Pulsed Amperometric Detection) verwendet. Das Oligosaccharidmolekül wird elektrochemisch oxidiert und der dabei entstehende Strom gemessen. Die PAD zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, so daß ein Nachweis im ng-Bereich ohne Schwierigkeiten möglich ist. Das Ausgangssignal am Detektor (in mV) ist der Menge an Kohlenhydrat direkt proportional. Die Quantifizierung erfolgt über die Integration der Peakflächen.

20

Die Proben wurden zwischen der Deglykosilierung und der Analyse bei -20°C zwischengelagert.

25

#### Literatur:

Townsend (1988): High-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides. Analytical Biochemistry 174, 459-470.

## Ergebnisse

### 1. Lys-C-Mapping

- 5 Das Lys-C-Mapping der Ansätze 11 bis 16 zeigte hinsichtlich der Retentionszeit und der Qualifizierung der Peptide keinen Unterschied zum Ausgangswert.

- 10 Die Bestimmung des Gehalts von Methioninsulfoxid während der Flüssiglagerung ergab die in den Tabellen 7 (Lagerung für 3 Monate) und 8 (Lagerung für 6 Monate) gezeigten Ergebnisse.

Tabelle 7

15

Bezeichnung	Anteil AP4ox	Anteil AP6ox	Anteil AP8ox	Anteil AP10ox
to-Wert	< 5%	7,6%	LOD	LOD
Formulierung 11	7,9%	10,5%	LOD	LOD
Formulierung 12	< 5%	11,6%	LOD	LOD
Formulierung 13	< 5%	7,3%	LOD	LOD
Formulierung 14	< 5%	9,4%	LOD	LOD
Formulierung 15	< 5%	8,6%	LOD	LOD
Formulierung 16	< 5%	10,8%	LOD	LOD

20

(LOD = nicht nachweisbar)

Tabelle 8

Bezeichnung	Anteil AP4ox	Anteil AP6ox	Anteil AP8ox	Anteil AP10ox
to-Wert	< 5%	7,6%	LOD	LOD
Formulierung 11	7,7%	9,5%	LOD	LOD
Formulierung 12	12,0%	13,7%	LOD	LOD
Formulierung 13	7,4%	8,7%	LOD	LOD
Formulierung 14	13,7%	15,7%	LOD	LOD
Formulierung 15	7,4%	7,9%	LOD	LOD
Formulierung 16	18,0%	17,6%	LOD	LOD

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, daß bei einer dreimonatigen Lagerung die methioninhaltigen Ansätze 13 und 15 gegenüber den methioninfreien Ansätzen einen etwas geringeren Anteil an Methioninsulfoxid zeigen. Nach einer sechsmonatigen Lagerung wird der Einfluß des zugesetzten Methionins in den Ansätzen 11, 13 und 15 etwas deutlicher. Dort ist nur eine sehr geringe Zunahme des Gehalts an Methioninsulfoxid nachweisbar. In den methioninfreien Ansätzen nimmt der Gehalt an Methioninsulfoxid etwas stärker zu, liegt aber in der Summe aller oxidierten Methioninanteile zum Gesamtgehalt an Methionin unter 10%.

## 2. Kohlenhydratbestimmung

In den Tabellen 9a, 9b, 10a, 10b, 11a und 11b sind die Ergebnisse der Kohlenhydratbestimmung nach drei bzw. nach 6 Monaten Lagerzeit angegeben.

Interferon- $\beta$ -1a besitzt an seiner Aminosäurenkette eine Kohlenhydratstruktur, die sich aus einer definierten Reihenfolge von Monosacchariden

aufbaut. Je nach Verzweigungsart spricht man von biantennären (2 Arme), triantennären (3 Arme) und tetraantennären (4 Arme) Strukturen.

Die Kohlenhydratstruktur baut sich aus den Monosacchariden Mannose,  
5 Fucose, N-Acetylglucosamin, Galactose und Sialinsäure auf.

Dabei nimmt die Sialinsäure in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein:

- Sie ist das einzige Monosaccharid mit einer geladenen Gruppe (Carboxylgruppe).
- 10 - Sie tritt immer endständig in der Kohlenhydratkette auf.
- Sie ist enzymatisch bzw. hydrolytisch wesentlich leichter abspaltbar als die restlichen Monosaccharide.
- Während die neutrale Kohlenhydratkette in ihrer Struktur sehr konstant ist, treten beim Anteil der Sialinsäure große Schwankungen  
15 auf, die unter anderem von der Zellkultur und dem Aufreinigungsverfahren des Interferons abhängig sind.

#### Literatur:

Kagawa et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 17508-17515; EP-A-0 529 300.

20

Es wurde der Sialostatus (prozentualer Anteil einzelner Sialostrukturen) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 9a) bzw. sechsmonatiger Lagerung (Tabelle 9b) untersucht. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig keine Sialinsäure enthält, wird als Asialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur die endständig eine Sialinsäure enthält, wird als Monosialo bezeichnet. Eine  
25 Kohlenhydratstruktur, die endständig zwei Sialinsäuren enthält, wird als Disialo bezeichnet. Eine Kohlenhydratstruktur, die endständig drei Sialinsäuren enthält, wird als Trisialo bezeichnet.

30

Weiterhin wurde die Antennarität (prozentualer Anteil einzelner Verzweigungsarten) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 10a) bzw. nach sechsmonatiger Lagerung (Tabelle 10b) bestimmt. Eine Kohlenhydratstruktur

mit einer Verzweigung und damit zwei endständigen Galactosen wird als  
biantennär bezeichnet. Sie kann terminal mit null bis zwei Sialinsäuren  
besetzt sein. Eine Kohlenhydratstruktur mit zwei Verzweigungen und damit  
drei endständigen Galactosen wird als triantennär bezeichnet. Sie kann  
5 terminal mit null bis drei Sialinsäuren besetzt sein.

Außerdem wurde der Sialyierungsgrad (prozentuale Belegung terminaler  
Galactosereste mit Sialinsäure) nach dreimonatiger Lagerung (Tabelle 11a)  
bzw. nach sechsmonatiger Lagerung (Tabelle 11b) untersucht.

10

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß durch die Lagerung bei pH 5 eine  
geringe, aber reproduzierbare Desialylierung stattfindet. Eine Lagerung bei  
pH 7 beeinflußt den Sialyierungsgrad nicht.

15

Der in den Ansätzen 15 und 16 angegebene afuco-Anteil stammt vermutlich  
von Fremdproteinen aus dem zugesetzten Humanserumalbumin, die durch  
die Anti- $\beta$ -Chromatographie nicht quantitativ abgetrennt wurden.

20

Bezüglich der Antennarität erfolgt kein meßbarer Einfluß durch die Flüssig-  
lagerung.

Tabelle 9a

5

10

Bezeichnung	Asialo	Monoasialo	Disialo	Trisialo
to-Wert	< 3	13,4	73,4	12,1
Formulierung 11	< 3	14,0	74,1	11,9
Formulierung 12	< 3	12,6	74,9	11,6
Formulierung 13	< 3	16,5	70,4	12,0
Formulierung 14	< 3	16,6	71,1	11,1
Formulierung 15	< 3	15,8	70,0	13,0
Formulierung 16	< 3	15,1	72,0	11,9

Tabelle 9b

15

20

Bezeichnung	Asialo	Monosialo	Disialo	Trisialo
to-Wert	< 3	13,4	73,4	12,1
Formulierung 11	< 3	14,5	73,9	11,6
Formulierung 12	< 3	14,0	72,4	13,6
Formulierung 13	< 3	18,6	68,9	11,7
Formulierung 14	< 3	19,0	69,4	10,7
Formulierung 15	< 3	17,0	71,0	11,3
Formulierung 16	< 3	16,1	71,5	12,4

25



Tabelle 10a

	Bezeichnung	Biantennär	Triantennär 1->6	Triantennär + 1 repeat
	to-Wert	74,4	18,1	3,7
5	Formulierung 11	72,9	18,7	3,7
	Formulierung 12	76,9	17,0	2,7
	Formulierung 13	74,7	18,0	3,1
	Formulierung 14	75,9	17,3	2,9
	Formulierung 15	76,2 (inkl. 5% afuco)	18,0	3,3
10	Formulierung 16	76,9 (inkl. 5% afuco)	17,8	3,0

Tabelle 10b

	Bezeichnung	Biantennär	Triantennär 1->6	Triantennär + 1 repeat
15	to-Wert	74,4	18,1	3,7
	Formulierung 11	73,0	18,7	3,3
	Formulierung 12	72,3	19,7	3,4
	Formulierung 13	72,4	19,2	3,4
	Formulierung 14	74,2	18,7	3,2
20	Formulierung 15	73,0	18,7	2,8
	Formulierung 16	74,3 (inkl. 4% afuco)	19,7	3,2

Tabelle 11a

5

Bezeichnung	Sialyierungsgrad
to-Wert	88,3
Formulierung 11	87,0
Formulierung 12	88,2
Formulierung 13	85,8
Formulierung 14	85,8
Formulierung 15	86,6
Formulierung 16	86,9

10

Tabelle 11b

15

Bezeichnung	Sialyierungsgrad
to-Wert	88,3
Formulierung 11	86,6
Formulierung 12	87,7
Formulierung 13	84,1
Formulierung 14	84,3
Formulierung 15	85,7
Formulierung 16	86,5

20

## Ansprüche

- 5 1. Flüssige Formulierung, die humanes Interferon- $\beta$  als Wirkstoff und einen Puffer zur Einstellung eines pH-Werts von 5 bis 8 enthält und eine Langzeitstabilität der biologischen Aktivität (in vitro) von mindestens 80% der Ausgangsaktivität nach Lagerung bei 25°C für 3 Monate aufweist.
- 10 2. Formulierung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein glykosiliertes Interferon- $\beta$  enthält.
- 15 3. Formulierung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- $\beta$  aus CHO-Zellen stammt.
- 20 4. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Puffer in einer Konzentration von 10 mmol/l bis 1 mol/l enthält.
- 25 5. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Puffer ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phosphat-, Citrat- und Acetatpuffern und Mischungen davon enthält.
- 30 6. Formulierung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Citratpuffer enthält.

7. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie einen pH-Wert zwischen 6 und 7,5 aufweist.
- 5 8. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie frei von Humanserumalbumin ist.
9. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß sie abgesehen vom Wirkstoff frei von humanen oder tierischen  
Polypeptiden ist.
10. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß sie frei von oberflächenaktiven Mitteln ist.
11. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß sie eine chemische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 6  
Monate aufweist.
12. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 daß sie eine physikalische Integrität nach Lagerung bei 25°C für 6  
Monate aufweist.
13. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
30 daß sie weiterhin eine oder mehrere Aminosäuren enthält.

14. Formulierung nach Anspruch 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie Methionin enthält.
- 5 15. Formulierung nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das Methionin in einer Konzentration von 0,1 bis 4 mmol/l  
vorliegt.
- 10 16. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie weiterhin Hilfsstoffe zur Einstellung der Tonizität enthält.
- 15 17. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie weiterhin Verdickungsmittel zur Viskositätserhöhung enthält.
- 20 18. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie weiterhin physiologisch verträgliche Konservierungsmittel  
enthält.
- 25 19. Pharmazeutisches Präparat,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es eine flüssige Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 18  
enthält.
- 30 20. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 19 zur oralen, parentera-  
len oder ophthalmologischen Applikation.

21. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparats nach Anspruch 19 oder 20,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und  
gegebenenfalls weitere galenisch notwendige Hilfsstoffe zubereitet  
und in eine geeignete Darreichungsform bringt.

# Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft flüssige Formulierungen von humanem Interferon- $\beta$ . Die Formulierungen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Puffer mit einem pH-Wert im schwach sauren bis neutralen Bereich zwischen 5 und 8 aufweisen sowie eine hohe Stabilität des Interferon- $\beta$  in Lösung unter Beibehalt der molekularen Integrität gegeben ist.

10

vo 23.09.97 10:49